



## CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE DE INVENCION número P 200401044, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 2004-04-30.

INDICACIÓN DE PRIORIDAD: El código del país con el número de su solicitud de prioridad, que ha de utilizarse para la presentación de solicitudes en otros países en virtud del Convenio de París, es: ES 200401044.

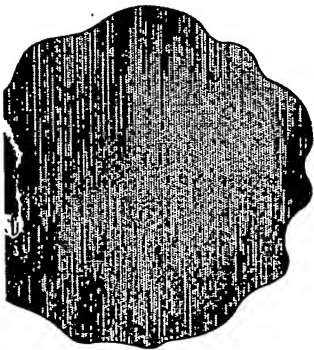
Madrid, 6 de Junio de 2005

El Director del Departamento de Patentes  
e Información Tecnológica

P.D.

ANA M<sup>a</sup> REDONDO MÍNGUEZ

BEST AVAILABLE COPY





MINISTERIO  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

# INSTANCIA DE SOLICITUD

NÚMERO DE SOLICITUD

**P200401044**

MODALIDAD:

☒ PATENTE DE INVENCION

☐ MODELO DE UTILIDAD

TIPO DE SOLICITUD:

☐ ADICION A LA PATENTE

☐ SOLICITUD DIVISIONAL

☐ CAMBIO DE MODALIDAD

☐ TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA

☐ PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:

MODALIDAD

Nº SOLICITUD

FECHA SOLICITUD

FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA PRESENTACION EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACION:

CODIGO

MADRID

28

(5) SOLICITANTE (S): APELLIDOS O DENOMINACION SOCIAL

CONSEJO SUP. INVESTIG. CIENTIFICAS

IONOSTRA, S.L.

NOMBRE

NACIONALIDAD

ESPAÑOLA

ESPAÑOLA

CODIGO PAIS

ES

ES

DNI/CIF

Q28/18002D

CNAE

PYME

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE:

DOMICILIO SERRANO, 117

LOCALIDAD MADRID

PROVINCIA MADRID

PAIS RESIDENCIA ESPAÑA

NACIONALIDAD ESPAÑOLA

TELÉFONO 91 585.50.00

FAX 91 585.52.87

CORREO ELECTRÓNICO ott@csic.es

CODIGO POSTAL 28006

CODIGO PAIS ES

CODIGO PAIS ES

(7) INVENTOR (ES):

APELLIDOS

RUIZ CASTÓN

BAUGAR GÓMEZ

BUQUE BUZO

NOMBRE

JOSÉ

IRENE

DANIEL

NACIONALIDAD

ESPAÑOLA

ESPAÑOLA

ESPAÑOLA

CODIGO

PAIS

ES

ES

ES

(8) ☐ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

☒ EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCION DEL DERECHO:

☒ INVEN. LABORAL

☐ CONTRATO

☐ SUCESION

(10) TÍTULO DE LA INVENCION:

PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION EN LEVADURAS DE CÁPSIDAS VIRALES VACÍAS COMPUESTAS POR  
PROTEÍNAS DERIVADAS DE pVP2 DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSTITIS INFECCIOSA (IBDV)

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:

☐ SI

☒ NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

PAIS DE ORIGEN

CODIGO  
PAIS

NÚMERO

FECHA

FECHA

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES

(15) AGENTE / REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCION POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CODIGO) (RELLENASE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

(16) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

☒ DESCRIPCION Nº DE PAGINAS:

☒ Nº DE REIVINDICACIONES:

☒ DIBUJOS. Nº DE PAGINAS:

☒ LISTA DE SECUENCIAS Nº DE PAGINAS:

☒ RESUMEN

☐ DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ TRADUCCION DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ DOCUMENTO DE REPRESENTACION

☒ JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD

☒ HOJA DE INFORMACION COMPLEMENTARIA

☐ PRUEBAS DE LOS DIBUJOS

☐ CUESTIONARIO DE PROSPECCION

☒ OTROS: AUTORIZACION

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

*Domingo*

(VER COMUNICACION)

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACION SOBRE LA TASA DE CONCESION:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOP, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986.

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

informacion@oepm.es

www.oepm.es

C/PANAMÁ, 1 • 28071 MADRID

BEST AVAILABLE COPY

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARCADOS EN ROJO



MINISTERIO  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

## HOJA DE INFORMACION COMPLEMENTARIA

NÚMERO DE SOLICITUD

200401044

FECHA DE PRESENTACIÓN

☐ PATENTE DE INVENCION

☐ MODELO DE UTILIDAD

(5) SOLICITANTES:	APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL	NOMBRE	NACIONALIDAD	CÓDIGO PAÍS	DNI/CIF	CNAE	PYME
(7) INVENTORES:		APELLIDOS		NOMBRE		NACIONALIDAD	
ABAITUA ELUSTONDO		FERNANDO		ES			
OÑA BLANCO		ANA Mª		ES			
GONZÁLEZ DE LLANO		Mª DOLORES		ES			
RODRÍGUEZ AGUIRRE		JOSÉ F.		ES			
RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ-ALBA		JUAN RAMÓN		ES			
(12) EXPOSICIONES OFICIALES:		LUGAR			FECHA		
(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:		CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA			
PAÍS DE ORIGEN							



MINISTERIO  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

NÚMERO DE SOLICITUD

**200401044**

FECHA DE PRESENTACIÓN

## RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

**PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN EN LEVADURAS DE CÁPSIDAS VIRALES VACÍAS COMPUESTAS POR PROTEÍNAS DERIVADAS DE pVP2 DEL VIRUS CAUSANTE DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV)**  
Las cápsidas vacías del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) están constituidas por ensamblaje de proteínas derivadas de la proteína pVP2 de IBDV, de distinto tamaño y tienen aplicación en la producción de vacunas y en la elaboración de vectores para terapia génica.

GRÁFICO

(VER INFORMACIÓN)



MINISTERIO  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA

EJEMPLAR ORIGINAL



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

(12)

## SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

P.2000401044

(21) NÚMERO DE SOLICITUD

(31) NÚMERO

DATOS DE PRIORIDAD

(32) FECHA

(33) PAÍS

(22) FECHA DE PRESENTACIÓN

(62) PATENTE DE LA QUE ES  
DIVISORIA

(71) SOLICITANTE (S)

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
BIONOSTRA, S.L.

DOMICILIO C/ Serrano, 117 - 28006 MADRID

NACIONALIDAD ESPAÑOLA

(72) INVENTOR (ES) JOSÉ RUIZ CASTÓN, IRENE SAUGAR GÓMEZ, DANIEL LUQUE BUZO, FERNANDO ABAITUA ELUSTONDO, ANA M<sup>a</sup> OÑA BLANCO, M<sup>a</sup> DOLORES GONZÁLEZ DE LLANO, JOSÉ F. RODRÍGUEZ AGUIRRE Y JUAN RAMÓN RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ-ALBA

(51) Int. Cl.

GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

(54) TÍTULO DE LA INVENCION

PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN EN LEVADURAS DE  
CÁPSIDAS VIRALES VACÍAS COMPUESTAS POR PROTEÍNAS  
DERIVADAS DE pVP2 DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE  
LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV)

(57) RESUMEN

PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN EN LEVADURAS DE CÁPSIDAS VIRALES VACÍAS COMPUESTAS POR PROTEÍNAS DERIVADAS DE pVP2 DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV)  
Las cápsidas vacías del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) están constituidas por ensamblaje de proteínas derivadas de la proteína pVP2 de IBDV, de distinto tamaño y tienen aplicación en la producción de vacunas y en la elaboración de vectores para terapia génica.

# PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN EN LEVADURAS DE CÁPSIDAS VIRALES VACÍAS COMPUESTAS POR PROTEÍNAS DERIVADAS DE pVP2 DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV)

5

## CAMPO DE LA INVENCION

La invención se relaciona con un procedimiento para la producción de cápsidas virales vacías compuestas por proteínas derivadas de la proteína pVP2 (pVP2\*) del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV). Dichas cápsidas pueden ser utilizadas en la producción de vacunas y en la elaboración de vectores para terapia génica.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) es un miembro de la familia Birnaviridae que infecta diferentes especies aviares y es el responsable directo de una grave enfermedad inmunosupresora causante de importantes pérdidas económicas en la industria avícola mundial (Sharma JM et al. 2000. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Developmental and Comparative Immunology* 24:223-235; van den Berg TP et al. 2000. Infectious bursal disease (Gumboro disease). *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 19:509-543).

Las partículas de IBDV son icosaédricas con una simetría T=13, carecen de envuelta y están formadas por una única capa proteica. Hasta el momento, las aproximaciones encaminadas a la obtención un modelo atómico para las partículas de IBDV han fracasado. Por ello, la información estructural disponible está basada en modelos tridimensionales generados a partir de imágenes obtenidas por criomicroscopía electrónica del virus purificado y de partículas virales vacías. En base a estos estudios, se ha comprobado que la superficie externa de la partícula está formada por un entramado continuo de 260 trímeros de la proteína VP2 (37 kDa) ordenados en cinco conformaciones diferentes. La cara interna de las partículas contiene 200 trímeros de la proteína VP3 (29 kDa), los cuales, independientes entre sí, se encuentran unidos a la zona basal de los trímeros de VP2. Se ha sugerido que un tercer polipéptido, VP4 (28 kDa), también podría formar parte de las partículas, estando situado en la base de los pentámeros que forman los vértices de la estructura icosaédrica.

Las proteínas VP2, VP3, y VP4 se producen a partir del procesamiento proteolítico de un polipéptido (o poliproteína) precursor de un tamaño de 109 kDa. Este precursor se procesa autocatalíticamente liberando los péptidos pVP2 (VPX), VP3 y VP4. El dominio VP4, que se localiza en la región central de la poliproteína, pertenece a la familia de las proteasas 1on y es el responsable del corte proteolítico. Los polipéptidos pVP2 y VP3 son los responsables directos del ensamblaje de las cápsidas. El péptido pVP2 sufre un último corte en su extremo C-terminal antes de dar lugar a la forma madura de la proteína (VP2), que es la que se encuentra en las partículas purificadas. Este procesamiento de pVP2 es necesario para la correcta formación de las cápsidas, y requiere la presencia de VP3, aunque la proteasa responsable aún no ha sido identificada. Como es conocido, la morfogénesis es un proceso vital para el ciclo vírico que requiere de pasos sucesivos asociados a modificaciones en los polipéptidos precursores. Por ello, los virus han desarrollado estrategias que permiten la secuencial y correcta interacción entre cada uno de sus componentes. Una de estas estrategias, utilizada con frecuencia por virus icosaédricos, es la utilización de polipéptidos provenientes de una única poliproteína como base de sus componentes estructurales. En estos casos, el adecuado procesamiento proteolítico de dicha poliproteína juega un papel crucial en el proceso de ensamblaje.

Las vacunas convencionales empleadas para el control de la bursitis infecciosa se basan en el empleo de cepas, con diferentes grados de virulencia, del propio IBDV crecidas en cultivo celular o en huevos embrionados. Los extractos que contienen el material infeccioso son sometidos a procesos de inactivación química para producir vacunas inactivadas o bien son empleados de forma directa para producir vacunas vivas atenuadas. Este último tipo de vacunas presenta los inconvenientes clásicos asociados con el empleo de vacunas vivas atenuadas, concretamente, el riesgo de mutaciones que reviertan la virulencia del virus o le hagan perder su inmunogenicidad.

Se han descrito vacunas sub-unidad recombinantes que comprenden la proteína VP2 de IBDV expresada en diversos sistemas de expresión, por ejemplo, bacterias, levaduras o baculovirus, normalmente en forma de proteína de fusión. Los resultados obtenidos en ensayos de inmunización de pollos con dichas vacunas no han sido completamente satisfactorios.

Las partículas pseudovirales (VLPs, del inglés "virus-like particles"), constituyen una alternativa al empleo de vacunas vivas atenuadas y de vacunas sub-unidad recombinantes. Las VLPs se obtienen por autoensamblaje de la totalidad o parte de las

sub-unidades constituyentes de la cápsida viral y mimetizan la estructura y propiedades antigénicas del virión nativo aunque carecen de material genético por lo que son incapaces de replicarse. Además de su aplicación con fines vacunales las VLPs pueden ser utilizadas como vectores de moléculas de interés biológico, por ejemplo, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, etc.

La utilización de diferentes vectores para la expresión de genes de IBDV ha permitido desarrollar sistemas de producción de ensamblados virales diferentes. En este sentido, se ha descrito la producción de distintas VLPs de IBDV mediante expresión de la poliproteína viral empleando distintos sistemas de expresión, por ejemplo, células de mamífero (Fernández-Arias A et al. 1998. Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *J. Gen. Virol.* 79:1047-54) o vectores alternativos basados en el empleo de baculovirus recombinantes (rBVs) (Vakharia VN. 1997. Development of recombinant vaccines against infectious bursal disease. *Biotechnology Annual Review* 3:151-68; Kibenge FS et al. 1999. Formation of virus-like particles when the polyprotein gene (segment A) of infectious bursal disease virus is expressed in insect cells. *Can J Vet Res* 63:49-55).

El empleo de dichos vectores virales ha permitido la producción en células de insecto de diferentes tipos de VLPs entre las que se incluyen partículas, formadas por ensamblaje de una proteína VP2 recombinante, de 20-30 nm de diámetro (Min-Ying Wang et al. 2000. Self-Assembly of the infectious bursal disease virus capsid protein, rVP2, expressed in insect cells and purification of immunogenic chimeric rVP2H particles by immobilized metal-ion affinity chromatography. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 67(1):104-111); VLPs con simetría T=1 obtenidas mediante expresión de una forma quimérica de la proteína VP2 (rVP2-456) (Martínez-Torre Cuadrada JL et al. 2000. Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology* 278:322-331); VLPs que contienen todas las proteínas presentes en la partícula viral (Maraver A et al. 2003. The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role for capsid formation. *Journal of Virology* 77:6438-49); y VLPs producidas por la expresión de una forma quimérica de la poliproteína viral formada por la fusión de ésta a una proteína heteróloga con el fin de mejorar la eficiencia en la formación de VLPs (Chevalier C et al. 2002. The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. *J. Virol.* 76:2384-92).



Los diversos procedimientos de producción de VLPs de IBDV descritos previamente adolecen de diferentes defectos que reducen o impiden su aplicabilidad para la generación de vacunas frente a IBDV ya que:

- 5 (i) los vectores desarrollados para producir VLPs de IBDV se basan en el empleo de virus recombinantes, derivados del virus vacunal o baculovirus, por lo que la producción de dichas VLPs se realiza a partir células de mamífero o de insecto; sin embargo, esos sistemas de producción son muy costosos para su aplicación en la producción a nivel industrial de vacunas veterinarias;
- 10 (ii) la producción de VLPs de IBDV en células de mamífero se basa en el empleo de recombinantes del virus vacunal; sin embargo, además de que ese sistema de producción tiene un costo muy elevado, el empleo de un virus recombinante capaz de infectar tanto mamíferos como aves, no reúne las condiciones de bioseguridad necesarias para su empleo como vacuna;
- 15 (iii) la producción de VLPs de IBDV en células de insecto empleando sistemas de expresión convencionales, por ejemplo, rBVs que expresan únicamente la poliproteína viral, además de costosa, es muy ineficiente y conduce a una producción de VLPs prácticamente nula; y
- 20 (iv) la producción de VLPs de IBDV en células de insecto mediante la expresión de una poliproteína quimérica, formada por la fusión de la fase de lectura abierta (ORF) correspondiente a una proteína heteróloga al extremo 3' de la ORF correspondiente a la poliproteína de IBDV, tiene como resultado la producción de VLPs de IBDV que contienen una proteína de fusión (VP3-proteína heteróloga), lo que introduce un elemento proteico no presente en viriones de IBDV, de efecto desconocido y de dudosa aplicabilidad en la
- 25 cadena de producción de carne de pollo para consumo humano.

Existe, por tanto, la necesidad de desarrollar un vector que permita la producción a nivel industrial de vacunas frente a IBDV que subsane la totalidad o parte de los inconvenientes mencionados previamente.

30 Las levaduras constituyen una alternativa a los sistemas de expresión previamente mencionados por razones de simplicidad y coste de producción. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha descrito la posibilidad de producir en levaduras cápsidas formadas por ensamblaje de la proteína VP2 de IBDV expresada en levaduras. Por el contrario, los resultados obtenidos por distintos grupos de investigadores señalan en la dirección opuesta, es decir, en

el sentido de que la expresión de la proteína VP2 de IBDV en levaduras no conduce a la formación de partículas o cápsidas. En relación con esto, Azad et al. (US 5.614.409) describen la producción de una forma altamente inmunogénica de una proteína VP2 recombinante (rVP2) de IBDV, en la que los 5 últimos restos de aminoácidos del extremo amino terminal de la VP2 nativa de IBDV han sido reemplazados por un octapéptido, mediante la expresión de la secuencia codificante de dicha rVP2 en levaduras. Sin embargo, como reconocen los mismos autores, el análisis por microscopía electrónica del material obtenido no reveló la formación de estructuras de partículas definidas (US 5.614.409, columna 8, líneas 64-67). Resultados similares parecen haber sido obtenidos por Pitcovski et al. (Pitcovski J et al. 2003. Development and large-scale use of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens. Vaccine 21:4736-4743) quienes, aunque describen la expresión del gen que codifica para la proteína VP2 de IBDV en *Pichia pastoris* y el empleo de un material parcialmente purificado que contiene dicha proteína rVP2 de IBDV para inmunizar animales, no describen la formación de cápsidas formadas por autoensamblaje de dicha rVP2 expresada en *P. pastoris*.

## COMPENDIO DE LA INVENCION

Ahora se ha encontrado, sorprendentemente, que es posible obtener cápsidas vacías de IBDV mediante la expresión y ensamblaje de una proteína pVP2\* de IBDV, en donde dicha proteína pVP2\* es una proteína cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto "n" de la proteína pVP2 de IBDV, en donde "n" es un número entero comprendido entre 441 y 501, en levaduras. Dichas cápsidas vacías de IBDV, formadas por autoensamblaje de dicha proteína pVP2\* de IBDV, se denominan VLPs-pVP2\* en esta descripción. Dichas VLPs-pVP2\* de IBDV contienen uno de los elementos proteicos antigénicamente más relevante presente en los viriones infectivos de IBDV por lo que son capaces de inducir una respuesta inmune o antigénica en un animal y, por tanto, pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o de diagnóstico.

En concreto, se ha observado que la expresión de una proteína pVP2\* de IBDV en *Saccharomyces cerevisiae* permite obtener VLPs-pVP2\* de IBDV. Dichas VLPs-pVP2\* tienen isometría T=1 y son inmunogénicas.

Estos resultados han permitido diseñar una nueva estrategia para la producción de las VLPs de IBDV proporcionadas por esta invención (VLPs-pVP2\*) que, a diferencia de

los métodos descritos previamente para la producción de VLPs de IBDV (generalmente basados en el empleo de virus recombinantes derivados del virus vacunal o de un baculovirus y en la producción de dichas VLPs a partir células de mamífero o de insecto, sistemas de producción inaceptables para la producción industrial de vacunas veterinarias por razones de bioseguridad, eficiencia y coste), permite la expresión y producción de VLPs de IBDV en levaduras con lo que se subsanan los problemas de bioseguridad y eficiencia y se consigue un significativo abaratamiento de los costes de producción, lo que permite su empleo en la producción industrial de vacunas frente a IBDV. Dicha estrategia se basa en la utilización de un sistema o vector de expresión génica que permite la expresión de una pVP2\* de IBDV en levaduras y la formación de VLPs-pVP2\* de IBDV, con un rendimiento muy elevado y con un coste económico muy bajo.

Las vacunas obtenidas utilizando dichas VLPs-pVP2\* presentan numerosas ventajas ya que, por una parte, se evita la manipulación de material altamente infeccioso, se previene el riesgo potencial de aparición de nuevos mutantes de IBDV y se elimina el uso de virus vivo en las explotaciones avícolas, previniéndose de este modo el riesgo de diseminación de cepas vacunales de IBDV al Medio Ambiente, y, por otra parte, permite el desarrollo de sistemas de diagnóstico diferencial para discriminar entre animales vacunados e infectados. Estos sistemas de diagnóstico diferencial se basan en la detección de anticuerpos frente a las proteínas VP2, VP3 y VP4 de IBDV. Los animales con IBDV desarrollan una fuerte respuesta humoral frente a ambas proteínas mientras que los animales inmunizados con VLPs-pVP2\* solo presentan anticuerpos frente a la proteína VP2 de IBDV.

Por tanto, en un aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para la producción de dichas VLPs-pVP2\* de IBDV basado en la expresión génica de una proteína pVP2\* de IBDV en levaduras.

Los sistemas de expresión y las levaduras desarrolladas para la puesta en práctica de dicho procedimiento de producción de dichas VLPs-pVP2\* de IBDV, así como su empleo para la producción de dichas VLPs-pVP2\* de IBDV, constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

Dichas VLPs-pVP2\* de IBDV, que presentan actividad antigénica o inmunogénica frente a la infección causada por IBDV, constituyen un aspecto adicional de esta invención. Asimismo, el empleo de dichas VLPs-pVP2\* de IBDV en la elaboración de medicamentos, tales como vacunas y vectores para terapia génica, y/o con fines de

diagnóstico constituye un aspecto adicional de esta invención. Dichas vacunas y vectores constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 La Figura 1 muestra una representación esquemática del plásmido pESCURAinv/pVP2-456. El plásmido contiene un fragmento de ADN que contiene la región correspondiente a la poliproteína de IBDV que codifica desde el resto 1 al resto 456 de la proteína VP2 de IBDV, bajo el control transcripcional del promotor inducible por galactosa denominado GAL1. Este plásmido fue utilizado para transformar un cultivo de la levadura  
10 *Saccharomyces cerevisiae* haploide cepa 499.

La Figura 2 muestra la purificación de estructuras derivadas de IBDV en células de *S. cerevisiae* transformadas con pESCURAinv/pVP2-456 y crecidas en presencia de galactosa (inductor) durante 18 h a 30°C. Los cultivos fueron recogidos y utilizados para la obtención de extractos que fueron posteriormente analizados mediante ultracentrifugación en gradientes  
15 lineales de sacarosa. Los carriles incluyen muestras correspondientes al extracto total sin fraccionar (I) y a las diferentes fracciones desde la zona inferior a la superior del gradiente (1-37) mediante SDS-PAGE y tinción con azul de coomassie (Figura 2A), y mediante Western blot empleando suero anti-VP2 de IBDV (Figura 2B). M indica los carriles cargados con marcadores de peso molecular (Dual Color, BIO-RAD).

20 La Figura 3 muestra la caracterización estructural de ensamblados derivados de IBDV producidos en células de *S. cerevisiae* transformadas con pESCURAinv/pVP2-456. La Figura 3A muestra la caracterización microscópica de VLPs-pVP2\* purificadas; las fracciones 21 a 26 del gradiente mostrado en la Figura 2 fueron mezcladas y analizadas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM); en la imagen mostrada se observa  
25 la presencia de numerosas partículas isométricas de un tamaño de 23 nm aproximadamente. La muestra fue teñida con acetato de uranilo. La Figura 3B muestra el resultado de un análisis bioquímico, concretamente, la muestra (VLP) fue analizada mediante SDS-PAGE seguido de tinción con azul de coomassie. El marcador de peso molecular (M) empleado fue Dual Color (BIO-RAD). La Figura 3C muestra el resultado de  
30 un análisis antigénico, concretamente, la muestra (VLP) fue analizada mediante Western blot empleando suero anti-VP2 de IBDV. En las Figuras 3B y 3C "M" indica el carril correspondiente a los marcadores de peso molecular (Dual Color, BIO-RAD).

La Figura 4 es un diagrama de barras que ilustra la caracterización de la respuesta humoral frente a VLPs-pVP2-456. Dichas VLPs-pVP2-456 fueron utilizadas para

inmunizar pollos SPF de 1 día (Ejemplo 2). La inmunización se realizó empleando un grupo de 7 pollos, con una única dosis de antígeno por vía intramuscular. Como control se utilizó un grupo de pollos que fueron inyectados por vía intramuscular con un volumen idéntico del diluyente del antígeno (PBS). Se tomaron muestras a intervalos de 7 días hasta el día 35. Las muestras de suero fueron analizadas mediante ELISA empleando una dilución de la muestra de suero de 1/500.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### Definiciones

El término VLP-pVP2\* (singular) o VLPs-pVP2\* (plural) de IBDV, tal como se utiliza en esta descripción, se refiere a cápsidas vacías del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), en ocasiones denominadas genéricamente VLP-pVP2\* o VLPs-pVP2\* de la invención, con isometría T=1, constituidas por ensamblaje de una proteína pVP2\*, en donde dicha proteína pVP2\* es una proteína cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto "n" de la proteína pVP2 de IBDV, en donde "n" es un número entero comprendido entre 441 y 501.

El término "IBDV", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a las diferentes cepas de IBDV pertenecientes a cualquiera de los serotipos (1 ó 2) conocidos [a título ilustrativo véase la revisión realizada por van den Berg TP, Etteradossi N, Toquin D, Meulemans G., en *Rev Sci Tech* 2000 19: 509-43].

El término "proteína pVP2\*" se refiere, en general, a una proteína cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto "n" de la proteína pVP2 de IBDV, en donde "n" es un número entero comprendido entre 441 y 501 e incluye a cualquiera de las diferentes formas de las proteínas pVP2 representativas de cualquiera de las mencionadas cepas de IBDV [NCBI protein databank], de acuerdo con la definición realizada por Sánchez y Rodríguez (1999) (Sánchez AB, Rodríguez JF. Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology*. 1999 Sep 15; 262(1):190-199) así como a proteínas sustancialmente homólogas a dichas proteínas pVP2 de IBDV, es decir, proteínas cuyas secuencias de aminoácidos tienen un grado de identidad, respecto a dichas proteínas pVP2 de IBDV, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos un 80%, más preferentemente de, al menos, un 90% y, aún más preferentemente de, al menos,

un 95%.

Las proteínas pVP2\* particulares se denominan siguiendo el formato "pVP2-n", donde "n" es el definido previamente. En una realización particular, dicha proteína pVP2\* es una proteína seleccionada del grupo formado por:

- 5 (i) la proteína pVP2-441, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 441 de la proteína pVP2 de IBDV;
- (ii) la proteína pVP2-452, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 452 de la proteína pVP2 de IBDV;
- 10 (iii) la proteína pVP2-456, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 456 de la proteína pVP2 de IBDV;
- (iv) la proteína pVP2-466, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 466 de la proteína pVP2 de IBDV;
- 15 (v) la proteína pVP2-476, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 476 de la proteína pVP2 de IBDV;
- (vi) la proteína pVP2-487, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 487 de la proteína pVP2 de IBDV;
- 20 (vii) la proteína pVP2-494, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 494 de la proteína pVP2 de IBDV; y
- 25 (viii) la proteína pVP2-501, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 501 de la proteína pVP2 de IBDV.

La proteína pVP2\* de IBDV presente en las VLPs-pVP2\* proporcionadas por esta  
 30 invención tiene una secuencia de aminoácidos que comprende entre 441 y 501 restos de aminoácidos, comenzando a partir del resto número 1, de cualquier proteína pVP2 representativa de cualquier cepa de IBDV, por ejemplo, de la proteína pVP2 de IBDV cepa Soroa [NCBI, número de acceso AAD30136]. En una realización particular, dicha proteína

pVP2\* de IBDV presente en las VLPs-pVP2\* proporcionadas por esta invención es la proteína pVP2-456 cuya secuencia de aminoácidos está comprendida entre el resto 1 y el resto 456 de la proteína pVP2 de IBDV cepa Soroa [NCBI, número de acceso AAD30136]. La secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2-456 de IBDV se  
 5 extiende desde el nucleótido 350 hasta al nucleótido 1719 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. NO: 1.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término "fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2\* de IBDV" incluye, además de las secuencias de nucleótidos de dichas fases de lectura abierta, otras fases de lectura abiertas análogas a las  
 10 mismas codificantes de proteínas pVP2\* de IBDV.

El término "análoga", tal como aquí se utiliza, pretende incluir cualquier secuencia de nucleótidos que puede ser aislada o construida sobre la base de la secuencia de nucleótidos codificantes de pVP2\* de IBDV, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más  
 15 nucleótidos, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia. En general, una secuencia de nucleótidos análoga a otra secuencia de nucleótidos es sustancialmente homóloga a dicha secuencia de nucleótidos. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "sustancialmente homóloga" significa que las secuencias de  
 20 nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad, a nivel de nucleótidos, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos, un 80%, más preferentemente de, al menos, un 90% y, aún más preferentemente de, al menos, un 95%.

#### VLPs-pVP2\* de IBDV: procedimiento para su producción y aplicaciones

25 Las VLPs-pVP2\* proporcionadas por esta invención pueden obtenerse mediante la expresión de dicha proteína pVP2\* de IBDV, en células hospedadoras apropiadas, en particular, levaduras, que contienen la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2\* de IBDV en una construcción génica. En una realización particular, dichas células hospedadoras apropiadas son levaduras transformadas con un sistema de expresión  
 30 adecuado que incluye una construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2\* de IBDV.

En un aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la producción de VLPs-pVP2\* de IBDV, en adelante procedimiento de la invención, que comprende cultivar

una levadura que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína pVP2\* de IBDV y que expresa dicha proteína pVP2\* de IBDV, y, si se desea, recuperar dichas VLPs-pVP2\* de la invención.

En una realización particular, el procedimiento de la invención comprende las etapas de:

a) cultivar células de levadura transformadas con un sistema de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína pVP2\* de IBDV, en donde dicha proteína pVP2\* es una proteína cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto "n" de la proteína pVP2 de IBDV, en donde "n" es un número entero comprendido entre 441 y 501, bajo condiciones que permiten la expresión de dicha proteínas pVP2\* y su ensamblaje para formar VLPs-pVP2\* de IBDV; y

b) si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar, dichas VLPs-pVP2\* de IBDV.

Como puede apreciarse, el procedimiento de la invención comprende la expresión génica de una proteína pVP2\* de IBDV mediante el empleo de un vector que permite la expresión de dicha proteína en levaduras. Para ello, el procedimiento de la invención comprende, como paso previo, la obtención de un sistema de expresión génica, tal como un sistema constituido por un plásmido que contiene una construcción génica que codifica para dicha proteína pVP2\* de IBDV, seguido de la transformación de levaduras con dicho sistema de expresión, la expresión de las proteínas recombinantes, y, si se desea, el aislamiento de las VLPs-pVP2\* de IBDV formadas por ensamblaje de dichas proteínas pVP2\* de IBDV, y, opcionalmente, la purificación de dichas VLPs-pVP2\*.

La obtención de levaduras transformadas con un sistema o vector de expresión que permite la expresión de la proteína pVP2\* de IBDV puede ser realizada por un experto en la materia en base a lo aquí descrito y al estado de la técnica sobre esta tecnología (pESC epitope tagging vectors Instructions manual. Stratagene [www.stratagene.com](http://www.stratagene.com); Sambrook J.1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.). Las levaduras transformadas se cultivan bajo condiciones, conocidas por los expertos en la materia, que permiten la expresión de las proteínas recombinantes (pVP2\*) y su ensamblaje para formar VLPs-pVP2\* de IBDV. Tras la expresión de dicha proteína pVP2\* de IBDV en levaduras, las proteínas pVP2\* expresadas se ensamblan y forman las VLPs-pVP2\* de IBDV, las cuales pueden ser aisladas o retiradas del



medio, y, si se desea, purificadas. El aislamiento y purificación de dichas VLPs-pVP2\* de IBDV de la invención puede realizarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante fraccionamiento en gradientes de sacarosa.

El sistema o vector de expresión utilizado para transformar levaduras comprende la  
 5 secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína pVP2\* de IBDV operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, y constituye un aspecto adicional de esta invención.

Por tanto, en otro aspecto, la invención proporciona un sistema o vector de expresión útil para transformar levaduras, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica  
 10 para una proteína pVP2\* de IBDV, en donde dicha proteína pVP2\* es una proteína cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto "n" de la proteína pVP2 de IBDV, en donde "n" es un número entero comprendido entre 441 y 501, estando dicha secuencia de nucleótidos codificante para dicha proteína pVP2\* de IBDV operativamente unida a unos elementos de control de  
 15 transcripción y, opcionalmente, de traducción.

En una realización particular, dicho sistema de expresión proporcionado por esta invención comprende la secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a una proteína pVP2\* seleccionada entre las proteínas pVP2-441, pVP2-452, pVP2-456, pVP2-466, pVP2-476, pVP2-487, pVP2-494 y pVP2-501.

Los elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, presentes  
 20 en dicho sistema de expresión incluyen promotores, que dirigen la transcripción de la secuencia de la proteína pVP2\* (a la que está operativamente unido), y otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de  
 25 replicación, activadores transcripcionales (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), etc., todas ellas útiles en levaduras.

Prácticamente cualquier sistema o vector de expresión apropiado puede ser utilizado en la generación de dicho sistema de expresión. A modo ilustrativo, dichos vectores incluyen plásmidos, cromosomas artificiales de levadura (YACs), etc. que pueden contener, además,  
 30 un origen de replicación heterólogo, por ejemplo, bacteriano, para que pueda ser amplificado en bacterias, así como un marcador utilizable para seleccionar las células transfectadas diferente al gen o genes de interés. Estos vectores de expresión pueden ser obtenidos por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia [Sambrook J et al. 1989.

Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory] y forman parte de la presente invención. En una realización particular, dicho sistema o vector de expresión es un plásmido, tal como un plásmido adecuado para transformar levaduras basado en un sistema de expresión pESC Yeast (Stratagene), por ejemplo, el plásmido pESCURA/pVP2-456 (Ejemplo 1.1) que contiene una construcción génica que codifica para la proteína pVP2-456 de IBDV y permite la producción de VLPs-pVP2\* de IBDV en levaduras.

El empleo del sistema de expresión génica proporcionado por esta invención para la producción y obtención de VLPs-pVP2\* de IBDV constituye un aspecto adicional de esta invención.

En otro aspecto, la invención proporciona una célula hospedadora, tal como una levadura, que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2\* de IBDV. En una realización particular, dicha célula hospedadora es una levadura transformada con un sistema de expresión proporcionado por esta invención que comprende una construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2\* de IBDV. Prácticamente cualquier levadura puede ser utilizada para la puesta en práctica del procedimiento de la invención; no obstante, en una realización particular, dicha levadura es una levadura del género *Saccharomyces*, por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, etc., una levadura del género *Pichia*, por ejemplo, *P. pastoris*, etc.

Las VLPs-pVP2\* de IBDV pueden ser utilizadas como vectores o vehiculizadores de productos de interés, tales como moléculas con actividad biológica, por ejemplo, fármacos, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc., por lo que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos, de diagnóstico o de investigación. En una realización particular, dichas moléculas de interés biológico incluyen polipéptidos de interés, tales como antígenos o inductores de respuestas inmunes en animales o humanos a los que se suministre, o bien incluyen secuencias de ácido nucleico, útiles en terapia génica, destinadas a ser introducidas en el interior de las células apropiadas.

Dichas VLPs-pVP2\* de IBDV pueden ser utilizadas para inmunizar animales, en particular, aves, *per se* o como vectores o vehiculizadores de moléculas con actividad biológica, por ejemplo, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, fármacos, etc., por lo que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o de diagnóstico. En una realización particular, dichas moléculas con actividad biológica incluyen antígenos o inductores de respuestas inmune en animales o humanos a los que se suministre, o bien fármacos que se liberan en

su sitio de acción específico, o bien secuencias de ácido nucleico, todas ellas útiles en terapia génica y destinadas a ser introducidas en el interior de las células apropiadas.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dichas VLPs-pVP2\* de IBDV en la elaboración de medicamentos tales como, vacunas, vectores para  
5 terapia génica (delivery systems), etc. En una realización particular, dicho medicamento es una vacuna destinada a conferir protección a animales, en particular, aves, frente a IBDV. En otra realización particular, dicho medicamento es un vector para terapia génica.

En otro aspecto, la invención proporciona una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de VLPs-pVP2\* de IBDV, junto con, opcionalmente, uno o más  
10 adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Dicha vacuna es útil para proteger animales, en particular, aves, frente a IBDV. En una realización particular, dichas aves se seleccionan del grupo formado por pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices y avestruces. En una realización preferida, la vacuna proporcionada por esta invención es una vacuna útil para proteger pollos de la infección causada por IBDV.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de VLPs-pVP2\* de la invención calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las  
15 características propias de las VLPs-pVP2\* de la invención y el efecto de inmunización a conseguir.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser  
20 utilizados en dichas vacunas son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de vacunas.

En una realización particular, dicha vacuna se prepara en forma de una solución o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina,  
25 solución salina tamponada con fosfato (PBS), o cualquier otro diluyente aceptable farmacéuticamente.

La vacuna proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada que dé como resultado una respuesta inmune protectora frente a la secuencia heteróloga o epítipo utilizado, para lo cual dicha vacuna se formulará  
30 en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la vacuna proporcionada por esta invención se efectúa por vía parenteral, por ejemplo, por vía intraperitoneal, subcutánea, etc.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados

limitativos del alcance de la misma. El Ejemplo 1 ilustra la obtención de VLPs-pVP2-456 de IBDV, mientras que el Ejemplo 2 pone de manifiesto la capacidad antigénica de dichas VLPs-pVP2-456 de IBDV en pollos.

5

## EJEMPLO 1

### Obtención de VLPs-pVP2\* mediante la expresión de diversas regiones de la proteína pVP2 en levaduras

#### 1.1 Obtención de VLPs-pVP2-456 mediante la expresión de la región 1-456 de la proteína pVP2 en levaduras

10 Con el fin de estudiar la posibilidad de obtener VLPs de IBDV formadas por autoensamblaje de la proteína pVP2-456, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 456 de la proteína pVP2 de IBDV, denominadas VLPs-pVP2-456, en cultivos de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) se generó el vector pESCURAinv/pVP2-456. El primer paso en la construcción  
15 del vector se realizó mediante el clonaje de la región codificante de la proteína pVP2-456 (restos 1-456 de la pVP2 de IBDV) en el vector pESCURAinv. El plásmido pESCURAinv se generó mediante digestión del vector pRS426 (Stratagene) con el enzima PvuII y religación de la mezcla de digestión. El vector resultante, pESCURAinv, contiene la región de clonaje múltiple en posición invertida con respecto a la del vector parental pRS426. El fragmento de  
20 DNA correspondiente a la proteína pVP2-456 se obtuvo mediante PCR con los oligonucleótidos identificados como Oligo I (SEQ ID NO: 2) y Oligo II (SEQ ID NO: 3) empleando como molde el plásmido pVOTE.2/Poly (Fernández-Arias A et al. 1998. Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79:1047-1054).  
25 El fragmento fue purificado, sometido a digestión con los enzimas BglII y HindIII y clonado en el vector pESCURAinv previamente digerido con los enzimas BamHI y HindIII. El plásmido resultante se denominó pESCURAinv/pVP2-456 (Figura 1).

El plásmido pESCURAinv/pVP2-456 se empleó para transformar un cultivo de la levadura *S. cerevisiae* haploide cepa 499 según un protocolo previamente descrito (Gietz &  
30 Woods. 2002. Transformation of yeast by the Liac/SS carrier DNA/PEG method. *Methods in Enzymology* 350:87-96). Las levaduras transformadas con el plásmido fueron seleccionadas mediante crecimiento en placas de medio SC (CSM + YNB, glucosa 2% y bacto agar) suplementadas con los aminoácidos triptófano, leucina e histidina y carentes de

uracilo (-Ura). Tras una incubación de 48 h a 30°C, se seleccionó una colonia que fue empleada para la realización de los subsiguientes análisis de expresión de proteínas y formación de VLPs. El análisis de la expresión de la proteína pVP2-456 y la formación de VLPs se realizó siguiendo un protocolo descrito previamente para la caracterización de VLPs de IBDV en otros sistemas de expresión (Fernández-Arias A et al. 1998. Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054; Lombardo E et al. 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73:6973-698).

La colonia seleccionada fue cultivada en medio líquido CSM (-Ura) + YNB suplementado con rafinosa al 2%. El cultivo se incubó a 30°C durante 24 h. Este cultivo fue empleado para inocular, a una densidad óptica (D.O.) de 0,2, un matraz de 200 ml de medio CSM (-Ura) + YNB suplementado con el inductor galactosa al 2%. El cultivo fue mantenido a 30°C durante 18 horas (hasta una D.O. entre 1,0 y 2,0). Las levaduras fueron centrifugadas a 3.000 rpm, durante 5 minutos a 4°C, se lavaron con agua destilada 1 vez, y el pellet fue resuspendido en tampón de lisis (TEN: Tris 10 mM, pH 8,0; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM) + inhibidores de proteasas 2X (Compl Roche). Para la lisis se añadió 1 volumen de "glass beads" (cuentas o perlas de vidrio) de un tamaño aproximado de 425-600 micrones (Sigma). Esta mezcla fue sometida al vortex vigoroso durante 30 segundos 4 veces, con intervalos de 30 segundos, y todo ello a 4°C. Tras ello se recuperó la fracción soluble por centrifugación de la mezcla de lisis a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Esta muestra fue sometida a fraccionamiento en un gradiente de sacarosa según un protocolo previamente descrito (Lombardo E et al. 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73:6973-6983). Las muestras obtenidas tras el fraccionamiento, así como una muestra del material de partida fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) [Current Protocols in Molecular Biology, Edited by: Fred M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, Kevin Struhl, John Wiley & Sons, [http://www.interscience.wiley.com/c\\_p/index.htm](http://www.interscience.wiley.com/c_p/index.htm)] y tinción con azul de coomassie (coomassie blue) e inmunodetección por Western blot empleando suero anti-VP2 [Current

Protocols in Molecular Biology, Edited by: Fred M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, Kevin Struhl, John Wiley & Sons, [http://www.interscience.wiley.com/c\\_p/index.htm](http://www.interscience.wiley.com/c_p/index.htm)]. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2. Como puede observarse en la Figura 2A, la tinción con azul de coomassie reveló la presencia de una proteína con el tamaño (42 kDa) esperado para pVP2-456, junto con proteínas de mayor masa molecular, en diferentes fracciones correspondientes a la zona central del gradiente. La Figura 2B, correspondiente al análisis mediante Western blot, muestra que la bandas detectadas mediante tinción con azul de coomassie corresponden a la proteína pVP2-456 tanto en su forma monomérica como en forma de oligómeros de alto peso molecular. Estos resultados demostraron de forma fehaciente la correcta expresión del polipéptido pVP2-456 en el cultivo de *S. cerevisiae* transformado con el plásmido pESCURAinv/pVP2-456.

A continuación, las distintas fracciones del gradiente fueron analizadas mediante microscopía electrónica de transmisión tal como se ha descrito previamente (Lombardo E et. al. 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73:6973-6983). Este análisis se realizó con el producto resultante de mezclar las fracciones 21 a 26 del gradiente indicado en la Figura 2. Como se muestra en la Figura 3A, el análisis mediante TEM de dichas fracciones del gradiente reveló la existencia de VLPs de IBDV en esa región del gradiente. Las VLPs obtenidas (VLPs-pVP2-456) son isométricas ( $T = 1$ ) y presentan un diámetro de 23 nm y aspecto circular. El subsiguiente análisis mediante SDS-PAGE (Figura 3B) e inmunoblot con suero anti-VP2 (Figura 3C), mostró que la fracción contenía la proteína pVP2-456 con un grado de pureza estimado de, al menos, 95%.

## 1.2 Obtención de VLPs-pVP2\* mediante la expresión de otras regiones de la proteína pVP2 en levaduras

Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.1 se generaron los vectores que se describen en la Tabla 1 que expresaban en levaduras las VP2\* que se relacionan en dicha Tabla 1, en la que se recoge, además, la isometría que presentan las VLPs-pVP2\* obtenidas y los iniciadores utilizados.

Tabla 1

Plásmido	pVP2*	Isometría	Iniciador directo	Iniciador inverso
pESCURAinv/pVP2-441	pVP2-441	(a)	SEQ. ID. NO: 2	SEQ. ID. NO: 4
pESCURAinv/pVP2-452	pVP2-452	(a)	SEQ. ID. NO: 2	SEQ. ID. NO: 5
pESCURAinv/pVP2-466	pVP2-466	(a) (b) (c) (d)	SEQ. ID. NO: 2	SEQ. ID. NO: 6
pESCURAinv/pVP2-476	pVP2-476	(a) (b) (e) (f)	SEQ. ID. NO: 2	SEQ. ID. NO: 7
pESCURAinv/pVP2-487	pVP2-487	N.D.	SEQ. ID. NO: 2	SEQ. ID. NO: 8
pESCURAinv/pVP2-494	pVP2-494	N.D.	SEQ. ID. NO: 2	SEQ. ID. NO: 9
pESCURAinv/pVP2-501	pVP2-501	N.D.	SEQ. ID. NO: 2	SEQ. ID. NO: 10
pESCURAinv/pVP2-512	pVP2-512	(f)	SEQ. ID. NO: 2	SEQ. ID. NO: 11

## NOTAS:

5       \* El número indica el número de restos de aminoácidos de pVP2 de IBDV de cada proteína.

(a) VLPs T = 1

(b) VLPs T = 7

(c) Túbulos 20 nm

10       (d) Capsómeros

(e) VLPs T = 13

(f) Túbulos 50 nm

## EJEMPLO 2

15       Caracterización de la inmunogenicidad de las VLPs-pVP2-456 de IBDV

Con el fin de determinar la inmunogenicidad de las VLPs-pVP2-456 (Ejemplo 1.1) se realizó un ensayo de inmunización en pollos de 1 día. Un grupo de 7 animales SPF (libre de patógenos específicos) fue inmunizado por vía intramuscular con una única dosis de 200 µl conteniendo 10 µg de VLPs-pVP2-456/animal diluidas en PBS. Un grupo similar fue inyectado con PBS. Se realizaron extracciones semanales de suero de cada uno de los animales de ambos grupos. Los sueros de cada grupo y fecha fueron mezclados para obtener un suero homogéneo (pool) representado por volúmenes equivalentes de cada individuo del grupo. Los sueros fueron analizados mediante ELISA. Para ello, los pocillos fueron tapizados con 10 ng de VLPs-pVP2-456. Los ensayos fueron realizados según un protocolo previamente descrito (Current Protocols in Immunology. Edited by: Barbara Bierer, John E. Coligan, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober, John

25

Wiley & Sons <http://www.interscience.wiley.com/cp/index.htm>). Los resultados obtenidos, reflejados en la Figura 4, demuestran que una única inmunización en ausencia de adyuvante produce una potente respuesta frente a la proteína pVP2-456.



## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de cápsidas vacías del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) [VLPs-pVP2\*] que comprende cultivar una levadura que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína pVP2\* de IBDV y que expresa dicha proteína pVP2\* de IBDV, y, si se desea, recuperar dichas VLPs-pVP2\*, en donde dicha proteína pVP2\* de IBDV es una proteína cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto "n" de la proteína pVP2 de IBDV, en donde "n" es un número entero comprendido entre 441 y 501.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende las etapas de:

- a) cultivar células de levadura transformadas con un sistema de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína pVP2\* de IBDV, bajo condiciones que permiten la expresión de dicha proteínas pVP2\* y su ensamblaje para formar VLPs-pVP2\* de IBDV; y
- b) si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar, dichas VLPs-pVP2\* de IBDV.

3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicha proteína pVP2\* de IBDV se selecciona del grupo formado por:

- (i) la proteína pVP2-441, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 441 de la proteína pVP2 de IBDV;
- (ii) la proteína pVP2-452, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 452 de la proteína pVP2 de IBDV;

(iii) la proteína pVP2-456, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 456 de la proteína pVP2 de IBDV;

5 (iv) la proteína pVP2-466, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 466 de la proteína pVP2 de IBDV;

10 (v) la proteína pVP2-476, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 476 de la proteína pVP2 de IBDV;

15 (vi) la proteína pVP2-487, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 487 de la proteína pVP2 de IBDV;

(vii) la proteína pVP2-494, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 494 de la proteína pVP2 de IBDV; y

20 (viii) la proteína pVP2-501, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 501 de la proteína pVP2 de IBDV.

25 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha levadura es del género *Saccharomyces* o del género *Pichia*.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que dicha levadura es *S. cerevisiae*, *S. pombe* o *P. pastoris*.

30

6. Un sistema de expresión, útil para transformar levaduras, que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína pVP2\* de IBDV operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en

donde dicha proteína pVP2\* es una proteína cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto "n" de la proteína pVP2 de IBDV, en donde "n" es un número entero comprendido entre 441 y 501.

5

7. Una levadura que comprende un sistema de expresión según la reivindicación 6.

8. Una levadura transformada con un sistema de expresión según la reivindicación 6.

10

9. Levadura según cualquiera de las reivindicaciones 7 ú 8, en el que dicha levadura es del género *Saccharomyces*.

10. Levadura según la reivindicación 9, en el que dicha levadura es *S. cerevisiae* o *S. pombe*.

15

11. Empleo de un sistema de expresión según la reivindicación 6, o de una levadura según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, para la producción de cápsidas virales vacías del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) [VLPs-pVP2\*].

20

12. Una cápsida vacía del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) [VLP-pVP2\*] obtenida según el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

25

13. Una cápsida vacía del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) [VLP-pVP2\*], caracterizada porque está constituida por ensamblaje de proteínas pVP2\* de IBDV expresadas en levaduras, en donde dicha proteína pVP2\* de IBDV es una proteína cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto "n" de la proteína pVP2 de IBDV, en donde "n" es un número entero comprendido entre 441 y 501.

30

14. Cápsida según cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13, en el que dicha proteína pVP2\* de IBDV se selecciona del grupo formado por:

- 5
- (i) la proteína pVP2-441, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 441 de la proteína pVP2 de IBDV;
- (ii) la proteína pVP2-452, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 452 de la proteína pVP2 de IBDV;
- 10
- (iii) la proteína pVP2-456, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 456 de la proteína pVP2 de IBDV;
- 15
- (iv) la proteína pVP2-466, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 466 de la proteína pVP2 de IBDV;
- 20
- (v) la proteína pVP2-476, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 476 de la proteína pVP2 de IBDV;
- 25
- (vi) la proteína pVP2-487, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 487 de la proteína pVP2 de IBDV;
- (vii) la proteína pVP2-494, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 494 de la proteína pVP2 de IBDV; y
- 30
- (viii) la proteína pVP2-501, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos comprendida entre el resto 1 y el resto 501 de la proteína pVP2 de IBDV.

15. Cápsida según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, caracterizada porque tiene isometría  $T=1$ .

5 16. Empleo de cápsidas vacías del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) [VLPs-pVP2\*], según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en la elaboración de un medicamento.

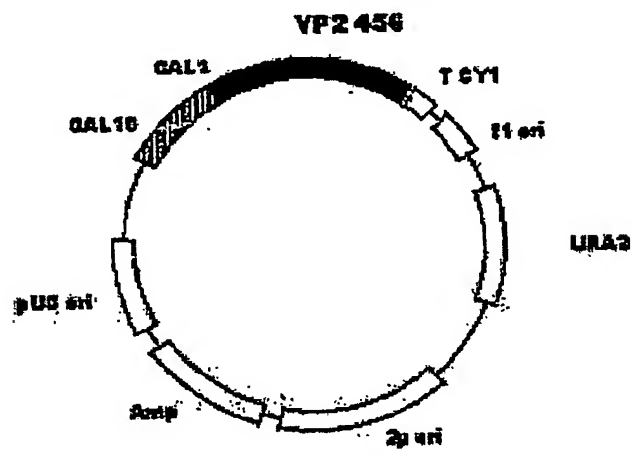
10 17. Empleo según la reivindicación 16, en el que dicho medicamento es una vacuna frente a la enfermedad aviar denominada bursitis infecciosa o un vector para terapia génica.

15 18. Una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de cápsidas vacías del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) [VLPs-pVP2\*], según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

19. Vacuna según la reivindicación 18, para proteger aves de la infección causada por el virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV).

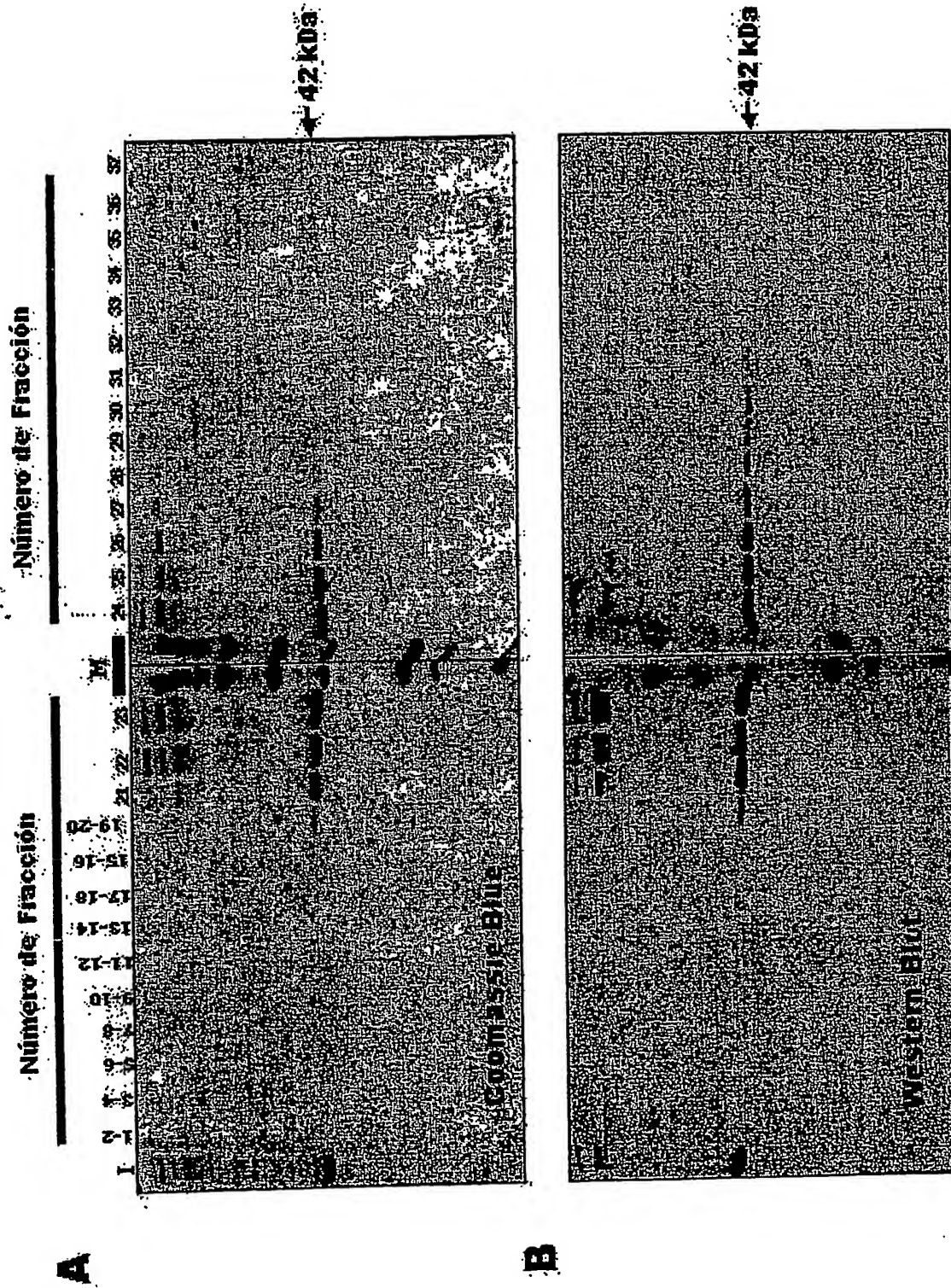
20 20. Vacuna según la reivindicación 19, en la que dichas aves se seleccionan del grupo formado por pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices y avestruces.

25 21. Una vacuna para proteger pollos de la infección causada por el virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV) que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de cápsidas vacías de IBDV [VLPs-pVP2\*], según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

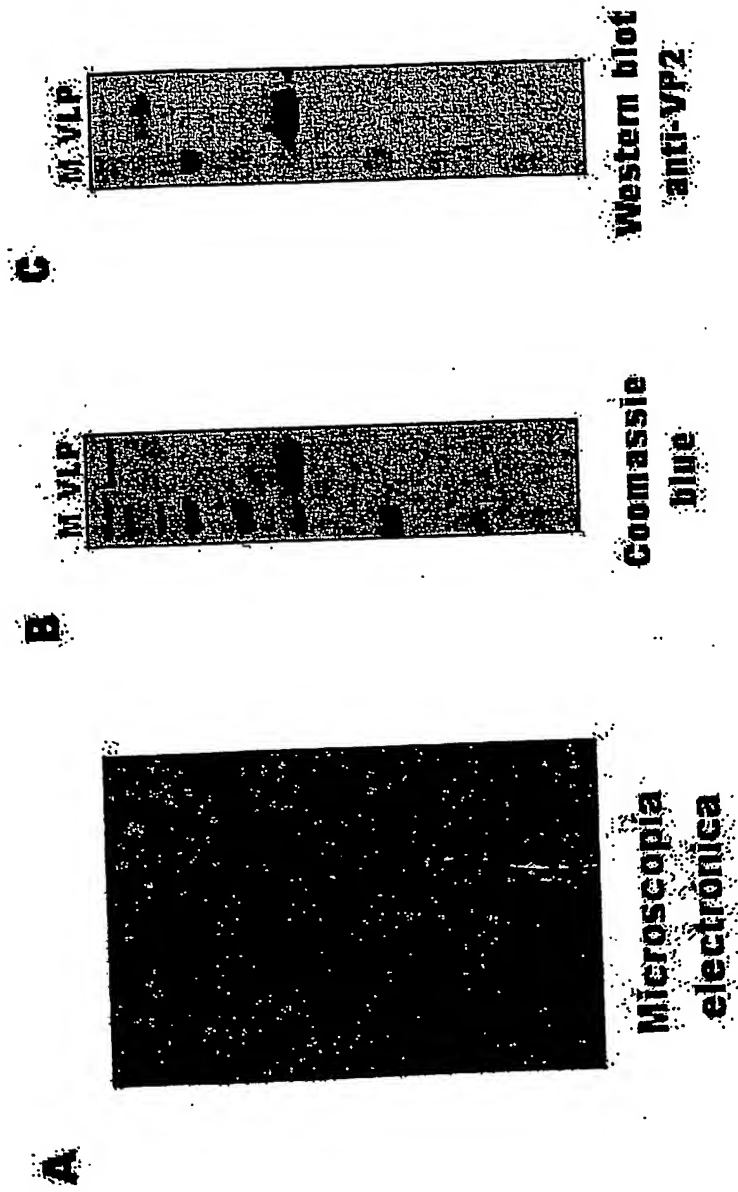


**pESCURA/pVP2-456**

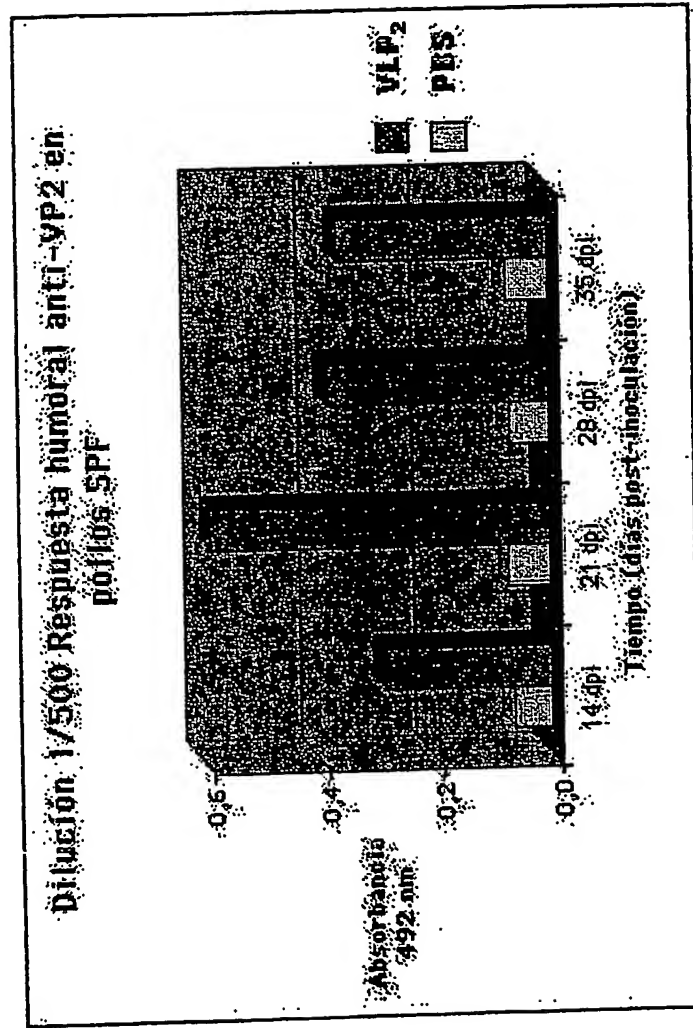
**Figura 1**



**Figura 2**

**Figura 3**





**Figura 4**

148 003

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
 <110> BIONOSTRA, S.L.

<120> PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN EN LEVADURAS DE CÁPSIDAS VIRALES  
 VACÍAS COMPUESTAS POR PROTEÍNAS DERIVADAS DE pVP2 DEL VIRUS CAUSANTE DE LA  
 ENFERMEDAD DE LA BURSTITIS INFECCIOSA (IBDV)

<160> 11

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 7929

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia nucleotídica del plásmido pESCURAinv/pVP2-456

<220>

<221> promotor

<222> (1)..(342)

<223> Promotor Gal1

<220>

<221> CDS

<222> (350)..(1719)

<223> Fase de Lectura Abierta de la proteína pVP2-456 de IBDV

<400> 1

cactgctccg	aacaataaag	attctacaat	actagctttt	atggttatga	agaggaaaaa	60
ttggcagtaa	cctggcccca	caaacccttca	aatgaacgaa	tcaaattaac	aaccatagga	120
tgataatgcg	attagttttt	tagccttatt	tctggggtaa	ttaatcagcg	aagcgatgat	180
ttttgatcta	ttaacagata	tataaatgca	aaaactgcat	aaccacttta	actaatactt	240
tcaacatttt	cggtttgat	tacttcttat	tcaaatgtaa	taaaagtatc	aacaaaaaat	300
tgtaaatata	cctctatact	ttaacgtcaa	ggagaaaaaa	ccccggatct	atgacaaacc	360
tgtcagatca	aaccagcgag	attgttccgt	tcatacggag	ccttctgatg	ccaacaaccg	420
gaccggcgtc	cattccggac	gacaccctgg	agaagcacac	tctcagggtca	gagaccctga	480
cctacaattt	gactgtgggg	gacacagggt	cagggctaata	tgtctttttc	cctggattcc	540
ctggctcaat	tgtgggtgct	cactacacac	tgcagggcaa	tggggaactac	aagtctcgatc	600
agatgctcct	gactgcccag	aacctaccgg	ccagttacaa	ctactgcagg	ctagtgaagc	660
ggagtctcac	agtgaaggtca	agcacacttc	ctgggtggcgt	ttatgcacta	aacggcacca	720
taaacgccgt	gaccttccaa	ggaagcctga	gtgaactgac	agatgttagc	tacaatgggt	780
tgatgtctgc	aacagccaac	atcaacgaca	aaattgggaa	cgtcctagta	ggggaagggg	840
tcaccgtcct	cagcttacc	acatcatatg	atcttgggta	tgtgaggctt	ggtgacccca	900
ttcccgcaat	agggcttgac	ccaaaaatgg	tagccacatg	tgacagcagt	gacaggccca	960
gagtctacac	cataactgca	gccgatgatt	accaattctc	atcacagtac	caaccagggtg	1020
gggtaacaat	cacactgttc	tcagccaaca	ttgatgccat	cacaagcctc	agcgttgggg	1080
gagagctcgt	gtttcgaaca	agcgtccacg	gccttgtagt	gggcgccacc	atctacctca	1140
taggctttga	tgggacaacg	gtaatcacca	gggctgtggc	cgcaaacaat	gggctgacga	1200
ccggcaccga	caaccttatg	ccattcaatc	ttgtgattcc	aacaaacgag	ataacccagc	1260
caatcacatc	catcaaactg	gagatagtga	cctccaaaag	tggtggtcag	gcaggggatc	1320
agatgtcatg	gtcggcaaga	gggagcctag	cagtgcagat	ccatgggtggc	aactatccag	1380
gggcccctccg	tcccgtcacg	ctagtggcct	acgaaagagt	ggcaacagga	tccgtcggtta	1440
cggctcgctgg	ggtgagcaac	ttcgagctga	tcccaaatcc	tgaactagca	aagaacctgg	1500
ttacagaata	cggcgatatt	gacccaggag	ccatgaacta	cacaaaattg	atactgagtg	1560
agagggaccg	tcttggcatc	aagaccgtct	ggccaacaag	ggagtacact	gactttcggtg	1620
aaacttcat	ggaggtggcc	gacctcaact	ctcccctgaa	gattgcagga	gcattcggct	1680
tcaaagacat	aatccggggc	ataaggagga	tagctgtgta	agcttggtac	cgcggttagc	1740

taagatccgc	tctaaccgaa	aaggaaggag	ttagacaacc	tgaagtctag	gtccctatatt	1800
atttttttat	agttatgtta	gtattaagaa	cgttatattat	atttcaaatt	tttctttttt	1860
ttctgtacag	acgctgttac	gcatgtaaca	ttatactgaa	aaccttgctt	gagaagggtt	1920
tgggacgctc	gaagatccag	ctggcgtaat	agcgaagagg	cccgcaccga	tcgccccttc	1980
caacagttgc	gcagcctgaa	tggcgaatgg	acgcgccttg	tagcggcgca	ttaagcgcg	2040
cgggtgtggt	ggttacgcgc	agcgtgaccg	ctacacttgc	cagcgcccta	gcgcccgtc	2100
ctttcgcttt	cttcccttcc	tttctcgcca	cgttcgccgg	ctttccccgt	caagctctaa	2160
atcgggggct	cccttttaggg	ttccgattta	gtgcttttac	gcacctcgac	cccaaaaaac	2220
ttgattaggg	tgatggttca	cgtagtgggc	catcgccctg	atagacggtt	tttcgcccct	2280
tgacgttgga	gtccacgttc	tttaatagtg	gactcttggt	ccaaactgga	acaacactca	2340
accctatctc	ggtctattct	tttgatttat	aagggatttt	gccgatttcg	gcctattggt	2400
taaaaaatga	gctgatttaa	caaaaaat	acgcgaattt	taacaaaata	ttaacggtta	2460
caatttcctg	atgcggtatt	ttctccttac	gcatctgtgc	ggtatttcac	accgcatagg	2520
gtaataactg	atataattaa	attgaagctc	taatttgatga	gtttagtata	catgcattta	2580
cttataaata	agttttttag	ttttgctggc	cgcactcttc	caaatatgct	tcccagcctg	2640
ctttctgtga	acgttcaccc	tctaccttag	catcccttcc	ctttgcaaat	agtccctctc	2700
caacaataat	aatgtcagat	cctgtagaga	ccacatcatc	cacggttcta	tactgttgac	2760
ccaatgcgtc	tcccttggtca	tctaaaccca	caccgggtgt	cataatcaac	caatcgtaac	2820
cttcatctct	tccacccatg	tctctttgag	caataaagcc	gataacaaaa	tctttgtcgc	2880
tcttcgcaat	gtcaacagta	cccttagtat	attctccagt	agatagggag	cccttgcatg	2940
acaattctgc	taacatcaaa	aggcctctag	gttcctttgt	tacttcttct	gccgcctgct	3000
tcaaaccgct	aacaatacct	gggcccacca	caccgtgtgc	attcgtaatg	tctgccctt	3060
ctgctattct	gtatacaccc	gcagagtact	gcaatttgac	tgtattacca	atgtcagcaa	3120
attttctgtc	tctgaagagt	aaaaaattgt	acttggcggg	taatgccttt	agcggcttaa	3180
ctgtgccttc	catggaaaaa	tcagtcaaga	tatccacatg	tgtttttagt	aaacaaattt	3240
tgggacctaa	tgcttcaact	aaactccagta	attccttggt	ggtacgaaca	tccaatgaag	3300
cacacaagtt	tgtttgcttt	tcgtgcatga	tattaaatag	cttggcagca	acaggactag	3360
gatgagtagc	agcacgttcc	ttatatgtag	ctttcgacat	gatttatctt	cgtttcctgc	3420
aggtttttgt	tctgtgcagt	tgggttaaga	atactgggca	atttcatggt	tcttcaacac	3480
tacatatgcg	tatatatacc	aatctaagtc	tgtgtccctt	ccttcgttct	tccttctggt	3540
cggagattac	cgaatcaaaa	aaattttcaa	gaaaccgaaa	tcaaaaaaaa	gaataaaaaa	3600
aaaatgatga	attgaattga	aaagctgtgg	tatggtgcac	tctcagtaca	atctgctctg	3660
atgccgcata	gttaagccag	ccccgacacc	cgccaacacc	cgctgacgcg	ccctgacggg	3720
cttgtctgct	cccggcatcc	gcttacagac	aagctgtgac	cgtctccggg	agctgcattg	3780
gtcagagggt	ttcaccggtc	tcaccgaaac	gcgcgagacg	aaagggcctc	gtgatacgcc	3840
tattttttata	ggttaatgtc	atgataataa	tggtttctta	gtatgatcca	atatcaaagg	3900
aaatgatagc	attgaaggat	gagactaatc	caattgagga	gtggcagcat	atagaacagc	3960
taaagggtag	tgctgaagga	agcatacgat	accccgcatg	gaatgggata	atatcacagg	4020
aggtactaga	ctacctttca	tcctacataa	atagacgcat	ataagtagc	atttaagcat	4080
aaacacgcac	tatgccgttc	ttctcatgta	tatatatata	caggcaacac	gcagatatag	4140
gtgcgacgtg	aacagtggag	tgatgtgctg	cagctcgctg	tgcattttctg	gaagcgctcg	4200
ttttcggaaa	cgctttgaag	ttcctatttc	gaagtttcta	ttctctagaa	agtataggaa	4260
cttcagagcg	cttttgaaaa	ccaaaagcgc	tgtgaagacg	cactttcaaa	aaacaaaaaa	4320
cgcaccggac	tgtaacgagc	tactaaaaata	ttgcgaatac	cgttccaca	aacattgctc	4380
aaaagtatct	ctttgtctata	tatctctgtg	ctatatccct	atataaccta	cccattccacc	4440
tttcgctcct	tgaacttgca	tctaaactcg	acctctacat	tttttatggt	tatctctagt	4500
attactcttt	agacaaaaaa	attgtagtaa	gaactattca	tagagtgaat	cgaaaacaat	4560
acgaaaatgt	aaacatttcc	tatacgtagt	atatagagac	aaaatagaag	aaaccgttca	4620
taattttctg	accaatgaag	aatcatcaac	gctatcactt	tctgttcaca	aagtatgcgc	4680
aatccacatc	ggtatagaat	ataatcgggg	atgcctttat	cttgaaaaaa	tgaccccgca	4740
gcttcgctag	taatcagtaa	acgcgggaag	tgagtcagg	ctttttttat	ggaagagaaa	4800
atagacacca	aagtagcctt	cttctaacct	tacaggaacct	acagtgcata	aagttatcaa	4860
gagactgcac	tatagagcgc	acaaaggaga	aaaaaagtaa	tctaagatgc	tttgttagaa	4920
aaatagcgct	ctcgggatgc	atttttgtag	aacaaaaaag	aagtatatag	tctttgttgg	4980
taaaatagcg	ctctcgcggt	gcatttctgt	tctgtaaaaa	tgacgctcag	attctttggt	5040
tgaaaaatta	gcgctctcgc	gttgcatttt	tgtttttaca	aaatgaagca	cagattcttc	5100
gttggttaaaa	tagcgctttc	gcgttgcat	tctgttctgt	aaaaatgcag	ctcagattct	5160
ttgtttgaaa	aattagcgct	ctcgcgttgc	atttttgttc	tacaaaaatga	agcacagatg	5220
cttcggttcag	gtggcacttt	tcgggggaaat	gtgcgcggaa	cccctatttg	tttatttttc	5280
taaatacatt	caaatatgta	tccgctcatg	agacaataac	cctgataaat	gcttcaataa	5340
tattgaaaaa	ggaagagtat	gagtattcaa	catttccgtg	tcgcccttat	tccctttttt	5400

```

gcggcatttt gccttctgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct 5460
gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc 5520
cttgagagtt ttgcgccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta 5580
tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac 5640
tattctcaga atgacttggt ttagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc 5700
atgacagtaa gagaattatg cagtgtctgcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac 5760
ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg 5820
gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac 5880
gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaaactggc 5940
gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt 6000
gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggg ttattgctga taaactctga 6060
gccggtgagc gtgggtctcg cggatatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc 6120
cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag 6180
atcgctgaga taggtgcctc actgattaaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca 6240
tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc 6300
ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt ttctgttcca ctgagcgtca 6360
gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcy cgtaatctgc 6420
tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcgggtggtt gtttgccgga tcaagagcta 6480
ccaactcttt ttccgaagggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt 6540
ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc 6600
gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg 6660
ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggg cgggctgaac ggggggttcg 6720
tgcacacagc ccagcttggg gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag 6780
ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc 6840
agggtcggaa caggagagcg cacgaggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat 6900
agtctgtcgc ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctctgcaggg 6960
gggcgagacc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttctt ggccttttgc 7020
tggccttttg ctacatggtt ctttctgcy ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt 7080
accgcctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca 7140
gtgagcgagg aagcggaaga gcgcccaata cgcaaaccgc ctctcccgc gcgttggccg 7200
attcattaat gcagctgaat tggagcgacc tcatgtata cctgagaaag caacctgacc 7260
tacaggaaa agttactcaa gaataagaat tttogtttta aaacctaa gtcactttaa 7320
aatttgata cactattttt tttataact tatttaataa taaaaatcat aaatcataag 7380
aaattcgctt atttagaagt gtcaacaacg tatctacca cgttttgacc cttttccatc 7440
ttttcgtaaa tttctggcaa ggtagacaag ccgacaacct tgattggaga cttgaccaa 7500
cctctggcga agaattgtta attaagagct cagatcttat cgctgtcatc cttgtaatcc 7560
atcgatacta gtgcggccgc ccttttagtga gggttgaatt cgaattttca aaaattctta 7620
cttttttttt ggatggacgc aaagaagttt aataatcata ttacatggca ttaccacat 7680
atacatatcc atatacatat ccatacttaa tcttacttat atgttggtga aatgtaaaga 7740
gccccattat cttagcctaa aaaaaccttc tctttgggaa tttcagtaat acgcttaact 7800
gctcattgct atattgaagt acggattaga agccgccgag cgggtgacag ccctccgaag 7860
gaagacletc ctccgtgcgt cctcgtcttc accggtcgcg ttcttgaaac gcagatgtgc 7920
ctcgcgcgcg

```

<210> 2

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligo I, oligonucleótido iniciador directo utilizado para la generación del fragmento de DNA codificante de la proteína PVP2-456 en combinación con la SEQ. ID. NO: 3

<400> 2

gcgcagatct atgacaaacc tgtcagatca aaccc

35

<210> 3

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligo II; Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la generación del fragmento de DNA codificante de la proteína pVP2-456 en combinación con la SEQ. ID. NO: 2

<400> 3  
gcgcaagctt acacagctat cctccttatg gc 32

<210> 4  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la generación del fragmento de DNA codificante de la proteína pVP2-441 en combinación con la SEQ. ID. NO: 2

<400> 4  
gcgcaagctt ttatgctcct gcaatcttca gg 32

<210> 5  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la generación del fragmento de DNA codificante de la proteína pVP2-452 en combinación con la SEQ. ID. NO: 2

<400> 5  
gcgcaagctt accttatggc ccggattatg tctttgaagc 40

<210> 6  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la generación del fragmento de DNA codificante de la proteína pVP2-466 en combinación con la SEQ. ID. NO: 2

<400> 6  
gcgcaagctt aggcaggtgg gaacaatgtg g 31

<210> 7  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la generación del fragmento de DNA codificante de la proteína pVP2-476 en combinación con la SEQ. ID. NO: 2

<400> 7

gcgcaagctt aaccttcccc aattgcatgg ggc 33

<210> 8  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la generación del fragmento de DNA codificante de la proteína pVP2-487 en combinación con la SEQ. ID. NO: 2

<400> 8  
gcgcaagctt aggcctgggc ctcacgcgcc agc 33

<210> 9  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la generación del fragmento de DNA codificante de la proteína pVP2-494 en combinación con la SEQ. ID. NO: 2

<400> 9  
gcgcaagctt aggcctcgagc agttcccgaa gc 32

<210> 10  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la generación del fragmento de DNA codificante de la proteína pVP2-501 en combinación con la SEQ. ID. NO: 2

<400> 10  
gcgcaagctt aaggtcttgc ttttcctgac gc 32

<210> 11  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador inverso utilizado para la generación del fragmento de DNA codificante de la proteína pVP2-512 en combinación con la SEQ. ID. NO: 2

<400> 11  
gcgcaagctt aggcgagagt cagctgcctt atgc 34

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/ES05/070052

International filing date: 27 April 2005 (27.04.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: ES  
Number: P200401044  
Filing date: 30 April 2004 (30.04.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 21 June 2005 (21.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINE(S) OR MARK(S) ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**